

JP04330284A

MicroPatent Report**GENE CODING DIAMINOPELARGONIC ACID  
AMINOTRANSFERASE AND DESTHIOBIOTIN SYNTHETASE  
AND ITS UTILIZATION**

[71] **Applicant:** MITSUBISHI  
PETROCHEM CO LTD

[72] **Inventors:** KOHAMA KEIKO;  
HOSOGANE MAYUMI;  
KOBAYASHI MIKI;  
HATAKEYAMA KAZUHISA . . .

[21] **Application No.:** JP03174757

[22] **Filed:** 19910620

[43] **Published:** 19921118

[30] **Priority:** JP 62572 19910304

[No drawing]

[Go to Fulltext](#)

[57] **Abstract:**

**PURPOSE:** To obtain a novel DNA fragment used for producing diaminopelargonic acid aminotransferase and desthiobiotin synthetase in a *Cornebacterium* type bacterial cell. **CONSTITUTION:** A DNA fragment containing a gene coding diaminopelargonic acid aminotransferase and desthiobiotin synthetase derived from a *Gorynebacterium* type bacterium. The fragment is synthesized by an ordinary DNA synthesizing device.  
**COPYRIGHT:** (C)1992,JPO&Japio

[51] **Int'l Class:** C12N01554 C12N00121 C12N00900 C12N00910  
C12N01552 C12N01554 C12R00113 C12N00121 C12R00113

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-330284

(43) 公開日 平成4年(1992)11月18日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/54	Z N A			
1/21		7236-4B		
9/00		7823-4B		
9/10		7823-4B		
		8828-4B		
			C 1 2 N 15/00	A

審査請求 未請求 請求項の数13(全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平3-174757	(71) 出願人	000006057 三菱油化株式会社 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号
(22) 出願日	平成3年(1991)6月20日	(72) 発明者	小浜 恵子 茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号三 菱油化株式会社筑波総合研究所内
(31) 優先権主張番号	特願平3-62572	(72) 発明者	細金 真由美 茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号三 菱油化株式会社筑波総合研究所内
(32) 優先日	平3(1991)3月4日	(72) 発明者	小林 幹 茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号三 菱油化株式会社筑波総合研究所内
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(74) 代理人	弁理士 小田島 平吉 (外1名) 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及びデスチオピオチンシンセターゼをコードする遺伝子並びにその利用

(57) 【要約】

【構成】 プレバクテリウム・フラバムMJ-233株から単離されるジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及びデスチオピオチンシンセターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片。

【効果】 このDNA断片を導入したコリネ型細菌内で複製増殖可能なプラスミドで形質転換されたプレバクテリウム・フラバムMJ-233は、ジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及び／又はデスチオピオチンシンセターゼの高い生産性を示す。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 コリネ型細菌由来のジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及びピオチン要求性セターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片。

【請求項2】 コリネ型細菌がピオチン要求性の菌株である請求項1記載のDNA断片。

【請求項3】 ピオチン要求性のコリネ型細菌がプレバクテリウム・フラバムMJ-233である請求項2記\*

## \*載のDNA断片。

【請求項4】 制限酵素S a l Iで切り出すことにより得られる大きさが約4.0kbである請求項3記載のDNA断片。

【請求項5】 下記表1に記載する制限酵素で切断した場合、下記表1に記載する認識部位数と切断断片の大きさを示す請求項2記載のDNA断片。

【表1】

表1

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
B a m H I	1	0.8、3.2
D r a I I	1	1.2、2.8
S a c I	1	1.8、2.2
X h o I	1	1.3、2.7

【請求項6】 次のDNA塩基配列で示されるジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼをコードする遺伝子

※伝子DNA断片。

```

ATGCAAAACC CCAGCTTGGC CGAGCTTGAT CACCGAAACA TCTGGCAGCC GTATGCGCGG 60
CCGGGCGTGC GCAACAGACT CGTCACCAAC ACTGATGGGG TGTCTTGAC GCTGGAAGAT 120
GGCAGCAGCC TGATTGACGC GATGAGCTCC TGGTGGTCGG CAATTATGG ACACGGACAC 180
CCCCGACTGA AACGTGCCGC CCAAAAACAA ATCGACACCA TGAGTCACGT CATGTTGCGC 240
GGACTAAGCC ACGAGCCCGC CATTAGCTC ACCCACAAC TCCTCAATCT CACTGGCAAT 300
GCCTTGACC ACGTCTTTTA TTCCGATTGG GGCTCGGTCT CGGTGGAGGT CGCCATCAAA 360
ATGGCACTGC AGGCCTCCAA AGGACAAGGC CACCCGGAAC GCACAAAAC CTCACTCTGG 420
CGGTCCGGCT ACCACGGAGA CACATTCACC GCGATGAGCG TGTGGGAGCC AGAAAATGGC 480
ATGCATAGCC TCTGAAAGG CACACTCCCC GAGCAGATT TCGCCCCCGC CCCACAGTT 540
CGGGGGTCAT CCGCGCAGGC AATTTCCGAG TACCTGCACA GCATGGAATT GCTTATGAC 600
GAGACCGTCT CCGCAATCAT CATCGAACC ATCGTCCAAG GCGCTGGAGG CATGCGCTTT 660
CAGCATGTGG CACTCATGA AGGAGTCGCG GCACTGTGCA AGAAGCAGCA TCGTTTCTTG 720
ATCGTCGATG AAATTGCCAC CGGTTTCGGC CGCACCAGTG AACTATTTC CAGGTTAAGC 780
AATGGCGTAC AACCAGACAT CATGTGTGTG GGCAAGGCC TCACCGGTGG ATTCATGTCT 840
TTTGCCGCCA CTGTATGCAC GGACAAGGTG GCTCAATTGA TCAGATCCCC AGAAGGCGGA 900
GGTGTGCTGA TGCATGGCCC CACCTTTATG GCTAATCCTC TGGCCTGTGA GGTTCGCAC 960
GCTTCGCTAG AAATCATGA GACCGGCATG TGGCAGAAAC AGGTTAAAAA AATCGAAGCC 1020
AACTTATCG CAGGCCCTTC CCCACTTCGA TGTATTCCAG GAGTTGCCGA TGTCCGGGTT 1080
CTCGGCGCGA TTGGCGTCAT CGAAATGGAA CAAAATGTGA ATGTGAAGA AGCCACTCAG 1140
GCTGCATTAG ATCACGGTGT GTGGATCGCG CCCTTTGGAC GCTTGTCTA TGTATGCC 1200
CCATATATCA CCACGTCAGA GCAATGCGCA CAGATCTGCC GCGCGCTTCA TGCTGCAGTT 1260
AAAGGAAAAA AA 1272

```

【請求項7】 次のアミノ酸配列を有するジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼをコードする遺伝子

```

Met Glu Asn Pro Ser Leu Arg Glu Leu Asp His Arg Asn Ile Trp His
1           5           10          15
Pro Tyr Ala Ala Pro Gly Val Arg Asn Arg Leu Val Thr Asn Thr Asp
20          25          30
Gly Val Phe Leu Thr Leu Glu Asp Gly Ser Thr Val Ile Asp Ala Met
35          40          45
Ser Ser Trp Trp Ser Ala Ile His Gly His Gly His Pro Arg Leu Lys
50          55          60
Arg Ala Ala Gln Lys Gln Ile Asp Thr Met Ser His Val Met Phe Gly

```

3		4
65	70	75
Gly Leu Thr His Glu Pro Ala Ile Lys Leu Thr His Lys Leu Leu Asn		80
	85	90
Leu Thr Gly Asn Ala Phe Asp His Val Phe Tyr Ser Asp Ser Gly Ser		95
	100	105
Val Ser Val Glu Val Ala Ile Lys Met Ala Leu Gln Ala Ser Lys Gly		110
	115	120
Gln Gly His Pro Glu Arg Thr Lys Leu Leu Thr Trp Arg Ser Gly Tyr		125
	130	135
His Gly Asp Thr Phe Thr Ala Met Ser Val Cys Asp Pro Glu Asn Gly		140
145	150	155
Met His Ser Leu Trp Lys Gly Thr Leu Pro Glu Gln Ile Phe Ala Pro		160
	165	170
Ala Pro Pro Val Arg Gly Ser Ser Pro Gln Ala Ile Ser Glu Tyr Leu		175
	180	185
His Ser Met Glu Leu Leu Ile Asp Glu Thr Val Ser Ala Ile Ile Ile		190
	195	200
Glu Pro Ile Val Gln Gly Ala Gly Gly Met Arg Phe His Asp Val Ala		205
	210	215
Leu Ile Glu Gly Val Ala Ala Leu Cys Lys Lys His Asp Arg Phe Leu		220
225	230	235
Ile Val Asp Glu Ile Ala Thr Gly Phe Gly Arg Thr Gly Glu Leu Phe		240
	245	250
Ala Thr Leu Ser Asn Gly Val Gln Pro Asp Ile Met Cys Val Gly Lys		255
	260	265
Ala Leu Thr Gly Gly Phe Met Ser Phe Ala Ala Thr Val Cys Thr Asp		270
	275	280
Lys Val Ala Gln Leu Ile Arg Ser Pro Glu Gly Gly Gly Val Leu Met		285
	290	295
His Gly Pro Thr Phe Met Ala Asn Pro Leu Ala Cys Glu Val Ser His		300
305	310	315
Ala Ser Leu Glu Ile Ile Glu Thr Gly Met Trp Gln Lys Gln Val Lys		320
	325	330
Lys Ile Glu Ala Lys Leu Ile Ala Gly Leu Ser Pro Leu Arg Cys Ile		335
	340	345
Pro Gly Val Ala Asp Val Arg Val Leu Gly Ala Ile Gly Val Ile Glu		350
	355	360
Met Glu Gln Asn Val Asn Val Glu Glu Ala Thr Gln Ala Ala Leu Asp		365
	370	375
His Gly Val Trp Ile Arg Pro Phe Gly Arg Leu Leu Tyr Val Met Pro		380
385	390	395
Pro Tyr Ile Thr Thr Ser Glu Gln Cys Ala Gln Ile Cys Arg Ala Leu		400
	405	410
His Ala Ala Val Lys Gly Lys		415
	420	

【請求項8】 次のDNA塩基配列で示されるデスチオ ビオチンシンセターゼをコードする遺伝子DNA断片。

ATGCCATTTT TATTTGTCAG CGGCACCGGA ACCGGGGTTG GAAAGACCTT CTCACAGCC 60  
 GTTTTGGTTC GTTACTTAGC CGATCAAGGA CACGATGTTT TCGCCGTAAA GCTCGTOCAA 120  
 ACAGGTGAAC TTCCAGGCGA AGGAGACATC TTCACCATG AACGCTTGAC TGGAATTGCT 180

5 6  
 GGAGAGGAAT TTGCTCGTTT CAAAGACCCT CTTGGCCAA ATCTGGCAGC CCGACGAGAG 240  
 GGGATCGAGC CAATACAGTT TGATCAGATT ATCTCGTGGC TTGCTGGTTT TGACGACCCA 300  
 GATCGCATCA TTGTGGTGGA GGGCGCTGGT GGCCTGCTGG TCAGATTAGG GGAAGATTTC 360  
 ACCCTGGCAG ATGTTGCCTC CGCTTTGAAT GCACCCCTAG TGATTGGAC AAGCACCGGA 420  
 TTGGGAAGCC TCAACGCTGC TGAATTAAGC GTTGAGGCAG CAAACGCGG AGGACTCACA 480  
 GTGTTGGGAG TCCTCGGCGG TTCGATCCCT CAAAATCCTG ATCTAGCTAC GATGCTTAAT 540  
 CTCGAAGAAT TTGAGAGAGT CACCGGCGTG CCCTTTTGGG GAGCTTTGCC GGAAGGGITG 600  
 TCACGGGTGG AGGGGTTCGT CGAAAAGCAA TCTTTCCGG CCCTTGATGC CTTAAGAAA 660  
 CCGCCGCCAA GGTGA 675

【請求項9】 次のアミノ酸配列を有するデスチオビオ チンシンセターゼをコードする遺伝子DNA断片。

Met Pro Phe Leu Phe Val Ser Gly Thr Gly Thr Gly Val Gly Lys Thr  
 1 5 10 15  
 Phe Ser Thr Ala Val Leu Val Arg Tyr Leu Ala Asp Gln Gly His Asp  
 20 25 30  
 Val Leu Pro Val Lys Leu Val Gln Thr Gly Glu Leu Pro Gly Glu Gly  
 35 40 45  
 Asp Ile Phe Thr Ile Glu Arg Leu Thr Gly Ile Ala Gly Glu Glu Phe  
 50 55 60  
 Ala Arg Phe Lys Asp Pro Leu Ala Pro Asn Leu Ala Ala Arg Arg Glu  
 65 70 75 80  
 Gly Ile Glu Pro Ile Gln Phe Asp Gln Ile Ile Ser Trp Leu Arg Gly  
 85 90 95  
 Phe Asp Asp Pro Asp Arg Ile Ile Val Val Glu Gly Ala Gly Gly Leu  
 100 105 110  
 Leu Val Arg Leu Gly Glu Asp Phe Thr Leu Ala Asp Val Ala Ser Ala  
 115 120 125  
 Leu Asn Ala Pro Leu Val Ile Trp Thr Ser Thr Gly Leu Gly Ser Leu  
 130 135 140  
 Asn Ala Ala Glu Leu Ser Val Glu Ala Ala Asn Arg Arg Gly Leu Thr  
 145 150 155 160  
 Val Leu Gly Val Leu Gly Gly Ser Ile Pro Gln Asn Pro Asp Leu Ala  
 165 170 175  
 Thr Met Leu Asn Leu Glu Glu Phe Glu Arg Val Thr Gly Val Pro Phe  
 180 185 190  
 Trp Gly Ala Leu Pro Glu Gly Leu Ser Arg Val Glu Gly Phe Val Glu  
 195 200 205  
 Lys Gln Ser Phe Pro Ala Leu Asp Ala Phe Lys Lys Pro Pro Ala Arg  
 210 215 220

【請求項10】 請求項1～9のいずれかに記載されたDNA断片が導入された組換えプラスミド。

【請求項11】 請求項1～9のいずれかに記載されたDNA断片と、プラスミドpBY503に由来するコリネ型細菌内で複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNA断片及び安定化機能を司る遺伝子を含むDNA断片を保有する組換えプラスミド。

【請求項12】 請求項10～11のいずれかに記載の組換えプラスミドで形質転換されたコリネ型細菌。

【請求項13】 請求項12記載のコリネ型細菌を培養

し、培養物中にジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及び/又はデスチオビオチンシンセターゼを生成せしめることを特徴とするジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及び/又はデスチオビオチンシンセターゼの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、ジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及びデスチオビオチンシンセターゼをコードする遺伝子、該遺伝子を有するDNA断

7

片を含む組換えプラスミド、該組換えプラスミドで形質転換されたコリネ型細菌並びに該コリネ型細菌を用いるジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及び/又はデスチオピオチンシンセターゼの製造法に関する。

【0002】ジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及びデスチオピオチンシンセターゼは、7-ケート-8-アミノペラルゴン酸からデスチオピオチンを生成するピオチン生合成反応に係る酵素であり、ピオチン製造において産業上重要な酵素である。

【0003】またピオチンは、ヒト、動物、植物及びある種の微生物の生育に必要とされるビタミンの1種であり、特に皮膚代謝の調整剤として、あるいはヒトの脱毛防止養毛剤として、あるいは、家畜飼料への添加剤として用いられる有用な物質である。

【0004】

【従来の技術】従来、微生物を用いたピオチンの製造法としては、バチルス (*Bacillus*) 属、エシエリヒア (*Escherichia*) 属、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 属、クロモバクテリウム (*Chromobacterium*) 属、シユードモナス (*Pseudomonas*) 属、アースロバクター (*Aerobacter*) 属等の微生物を用いる方法が知られている。(特開昭56-160998号公報)。またこれら野生株に人工的に突然変異を生起させてピオチン生産能を付与する方法も提案されている(例えば H. Yamagata et al, *Agri. Biol. Chem.*, 47, 1611, 1983)。しかしながら、微生物を用いてピオチンを製造しようとする場合、野生株はピオチンによる強力なフィードバック抑制機構のため(Y. Izumi, K. Ogata, *Adv. Appl. Microbiol.* 22, 155-157, 1977)。ピオチンは極少量しか生成されない。また変異株を用いる方法でも生成量は必ずしも満足し得るものではなかつた。

【0005】また、工業的利用上多くの利点を有するブレヴィバクテリウム属及びコリネバクテリウム属細菌を含むコリネ型細菌のある種の菌株、例えばブレヴィバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) MJ-233、ブレヴィバクテリウム・ラクトファーメンタム (*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC13869、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC31831、ブレヴィバクテリウム・アンモニアゲネス (*Brevibacterium ammoniagenes*) ATCC13745等は、ピオチン要求性を有しており、ピオチンを全く生産しないことが知られている。

【0006】ピオチンの生合成に関与する遺伝子としては、エシエリヒア・コリ由来の遺伝子がよく研究されており、bioA、bioB、bioC、bioD、bioF、bioH遺伝子が存在することが知られている。このうち、bioAは7、8-ジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ、bioBはピオチンシンセターゼ、bioCはビメリルCoAシンセターゼ、bioDはデスチオピオチンシンセターゼ、bioFは7-ケ

8

ト-8-アミノペラルゴン酸シンセターゼをそれぞれコードすることが知られ、bioHについては、その働きは、また明らかでない(A. J. Otsuka et. al., *J. Biol. Chem.* 263, 19577-19585, 1988)。また、bioA、bioB、bioC、bioD、bioF遺伝子はbioABFCDなるオペロンを形成しており、その発現は、bioAとbioB遺伝子の間に存在するオペレーターにより制御されることがわかっている。また、そのオペレーターの制御はbirA遺伝子にコードされたピオチンリプレッサーが、ピオチンにより活性化されることによりオペレーターに結合し、ピオチン生合成オペロンの発現を抑制することが知られている。(J. Biol. Chem. 263, 1013-1016, 1988)。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】この発明は、コリネ型細菌のピオチン生合成に関与する遺伝子を解析・単離し、該遺伝子を同種であるコリネ型細菌に導入し、該遺伝子産物を効率的にコリネ型細菌から取得することを目的としてなされたものである。

20 【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた。その結果、ピオチン要求性の大腸菌変異株を用いる交差相補性試験により、ピオチン要求性のコリネ型細菌は、少なくともbioB、bioA、bioDの三種のピオチン生合成に関与する遺伝子を保有していることが明らかとなり、該遺伝子を適当なベクタープラスミドに導入して、コリネ型細菌を形質転換し、該コリネ型細菌を培養することにより、培養物中に効率的にピオチン生合成に関与する酵素が生成することを発見し本発明を完成するに至つた。

【0009】かくして本発明によれば、(1)コリネ型細菌由来のジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及びデスチオピオチンシンセターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片、(2)該DNA断片が導入された組換えプラスミド、(3)該組換えプラスミドで形質転換されたコリネ型細菌、(4)該コリネ型細菌を培養し、培養物中にジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及び/又はデスチオピオチンシンセターゼを生成せしめることを特徴とするジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及び/又はデスチオピオチンシンセターゼの製造法が提供される。

【0010】以下本発明についてさらに詳細に説明する。

【0011】本発明の「ジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及び/又はデスチオピオチンシンセターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片」(以下これを「bioA bioD断片」と略称することがある)は、7-ケート-8-アミノペラルゴン酸から7、8-ジアミノペラルゴン酸への変換反応を触媒する酵素、すなわちジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼを

コードする以下 (bioA) 及び/又は7, 8-ジアミノペラルゴン酸からデスチオピオチンへの変換を触媒する酵素、すなわちデスチオピオチンシンセターゼをコードする遺伝子 (bioD) の両遺伝子又はいずれか一方の遺伝子を含むDNA断片である。

【0012】上記bioA bioD断片の供給源となる微生物は、コリネ型細菌であれば特に限定されるものではないが、一般的には、プレバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497) およびその由来株、プレバクテリウム・アンモニアゲネス (Brevibacterium ammoniagenes) ATCC 6871、同ATCC 13745、同ATCC 13746、プレバクテリウム・デバリカタム (Brevibacterium divaricatum) ATCC 14020、プレバクテリウム・ラクトファーマンタム (Brevibacterium lactofermentum) ATCC 13869、コリネバクテリウム・グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) ATCC 31831等が有利に使用される。

【0013】これらの供給源微生物からbioA bioD断片を調製するための基本操作の一例を述べれば次のとおりである。

【0014】上記bioA bioD断片は、上記コリネ型細菌、例えばプレバクテリウム・フラバムMJ-233株 (FERM BP-1497) の染色体上に存在し、この染色体を適当な制限酵素で切断することにより生ずる切断断片の中から以下に述べる方法で分離、取得することができる。

【0015】まず、プレバクテリウム・フラバムMJ-233株の培養物から染色体DNAを抽出する。この染色体DNAを適当な制限酵素、例えばSau3AIを用いて、DNA断片の大きさが約20~30kbになるように部分分解する。

【0016】得られたDNA断片をコスミドベクター例えばpWE15に挿入し、このコスミドを、λDNA in vitro Packaging Kitを用いる形質導入により、bioAあるいはbioDの欠損した大腸菌変異株 (Journal of Bacteriology, vol 94, p2065-2066, 1967及びJournal of Bacteriology vol 112, p830-839, 1972参照) に導入する。この大腸菌変異株を、ピオチンを含まない選択培地に塗抹する。

【0017】得られる形質転換株よりコスミドDNAを抽出し、制限酵素で解析することにより挿入されたプレバクテリウム・フラバムMJ-233株染色体由来のbioA bioD断片を確認・取得することができる。

【0018】かくして得られるbioA bioD断片は、大きさが約20~30kbと大きく、実用的でないで、さらに短い断片に特定化する必要がある。

【0019】次に、上記で得られたbioA bioD

表1

断片を含むコスミドを適当な制限酵素を用いて切断し、得られるDNA断片を、大腸菌で複製可能なベクタープラスミドに挿入しこのベクタープラスミドを通常用いられる形質転換法、例えば、塩化カルシウム法あるいは電気パルス法による形質転換により、前記bioAあるいはbioDの欠損した大腸菌変異株に導入する。この大腸菌変異株を、ピオチンを含まない選択培地に塗抹する。

【0020】得られる形質転換株よりプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で解析することにより挿入されたプレバクテリウム・フラバムMJ-233株染色体由来のbioA bioD断片を確認・取得することができる。

【0021】このようにして得られるbioA bioD断片の一つは、前記プレバクテリウム・フラバムMJ-233株の染色体DNAを制限酵素Sau3AIの部分分解により切り出し、さらにそれを、制限酵素SalIで切り出すことによつて得られる大きさが約4.0kbのDNA断片を挙げることができる。

【0022】この約4.0kbのbioA bioD断片を、各種の制限酵素で切断したときの認識部位数及び切断断片の大きさを下記表1に示す。

【0023】なお、本明細書において、制限酵素による「認識部位数」は、DNA断片又はプラスミドを、過剰の制限酵素の存在下で完全分解し、それらの分解物をそれ自体既知の方法に従い1%アガロースゲル電気泳動およびポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、分離可能な断片の数から決定した値を採用した。

【0024】また、「切断断片の大きさ」及びプラスミドの大きさは、アガロースゲル電気泳動を用いる場合には、エシエリヒア・コリのラムダファージ (λphage) のDNAを制限酵素Hind IIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一アガロースゲル上での泳動距離で描かれる標準線に基づき、また、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いる場合には、エシエリヒア・コリのファイ・エックス174ファージ (φ×174 phage) のDNAを制限酵素Hae IIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一ポリアクリルアミドゲル上での泳動距離で描かれる標準線に基づき、切断DNA断片又はプラスミドの各DNA断片の大きさを算出する。プラスミドの大きさは、切断断片それぞれの大きさを加算して求める。なお、各DNA断片の大きさの決定において、1kb以上の断片の大きさについては、1%アガロースゲル電気泳動によつて得られる結果を採用し、約0.1kbから1kb未満の断片の大きさについては4%ポリアクリルアミドゲル電気泳動によつて得られる結果を採用した。

【0025】

【表2】

11

12

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
BamH I	1	0.8, 3.2
Dra I I	1	1.2, 2.8
Sac I	1	1.8, 2.2
Xho I	1	1.3, 2.7

上記表1中、2.7 kbのXho I切断断片もまたジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及びデスチオピオチンシンセターゼをコードする機能を有していることが確認されており、従つて、この切断断片もまた本発明のDNA断片に包含される。

【0026】かくして、上記したbioA bioD DNA断片中に含まれるbioA bioDは、プレバクテリウム・フラバムMJ-233染色体DNAを制限\*

\*酵素Sal I及びXho Iで切り出すことによつて得られる大きさが約2.7 kbのDNA断片中に含まれるものと考えられる。

【0027】上記約2.7 kbのDNA断片を、さらに各種の制限酵素で切断したときの認識部位数及び切断断片の大きさを下記表2に示す。

【0028】

【表3】

表 2

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
Sac I	1	0.9, 1.8
Dra I I	1	1.5, 1.2
BamH I	1	1.9, 0.8

かくして得られるDNA断片の遺伝子コード機能の解析により、bioA、bioDは、制限酵素Xho I及びSal Iで切り出すことによつて得られる2.7 kb中のDNA断片中の、Xho I部位側にbioA、その下流Sal I部位側にbioDの位置関係を有して配列が存在すると考えられる。

【0029】以上に詳述した大きさが約4.0 kb、約2.7 kbのbioA bioD DNA断片の制限酵素切断点を図1に示す。

【0030】一方、上記したプレバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体を、制限酵素Sal Iを用いて切り出すことにより得られる大きさが約4.0 kbのDNA断片を用いて、その塩基配列をプラスミドpUC

18またはpUC19を用いるジデオキシヌクレオチド酵素法 (dideoxy chain termination 法) (Sanger, P. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 5463, 1977) により決定することができる。

【0031】かくして、塩基配列中のオープンリーディングフレームの存在から決定されたジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼをコードする遺伝子 (bioA) は、次の配列番号1で示される配列を有する423のアミノ酸をコードする1269の塩基対より構成され、またデスチオピオチンシンセターゼをコードする遺伝子 (bioD) は、次の配列番号2で示される配列を有する224のアミノ酸をコードする672の塩基対より構成される：

配列番号：1

```

ATG GAA AAC CCC AGC TTG CGC GAG CTT GAT CAC CGA AAC ATC TGG CAC 48
Met Glu Asn Pro Ser Leu Arg Glu Leu Asp His Arg Asn Ile Trp His
1           5           10          15
CCG TAT GCC GCG CCG GCG GTG CGC AAC AGA CTC GTC ACC AAC ACT GAT 96
Pro Tyr Ala Ala Pro Gly Val Arg Asn Arg Leu Val Thr Asn Thr Asp
20          25          30
GGG GTG TTC TTG ACG CTG GAA GAT GGC AGC ACC GTG ATT GAC GCG ATG 144
Gly Val Phe Leu Thr Leu Glu Asp Gly Ser Thr Val Ile Asp Ala Met
35          40          45
AGC TCC TGG TGG TCG GCA ATT CAT GGA CAC GGA CAC CCC CGA CTG AAA 192
Ser Ser Trp Trp Ser Ala Ile His Gly His Gly His Pro Arg Leu Lys
50          55          60
CGT GCC GCC CAA AAA CAA ATC GAC ACC ATG AGT CAC GTC ATG TTC GGC 240
Arg Ala Ala Gln Lys Gln Ile Asp Thr Met Ser His Val Met Phe Gly
65          70          75          80
GGA CTA ACC CAC GAG CCC GCC ATT AAG CTC ACC CAC AAA CTC CTC AAT 288
Gly Leu Thr His Glu Pro Ala Ile Lys Leu Thr His Lys Leu Leu Asn
85          90          95

```



13	14
CTC ACT GGC AAT GCC TTT GAC CAC GTC TTT TAT TCC GAT TCG GGC TCG	336
Leu Thr Gly Asn Ala Phe Asp His Val Phe Tyr Ser Asp Ser Gly Ser	
100	105
GTC TCG GTG GAG GTC GCC ATC AAA ATG GCA CTG CAG GCC TCC AAA GGA	384
Val Ser Val Glu Val Ala Ile Lys Met Ala Leu Gln Ala Ser Lys Gly	
115	120
CAA GGC CAC CCG GAA CGC ACA AAA CTC CTC ACC TGG CGG TCC GGC TAC	432
Gln Gly His Pro Glu Arg Thr Lys Leu Leu Thr Trp Arg Ser Gly Tyr	
130	135
CAC GGA GAC ACA TTC ACC GCG ATG AGC GTG TGC GAC CCA GAA AAT GGC	480
His Gly Asp Thr Phe Thr Ala Met Ser Val Cys Asp Pro Glu Asn Gly	
145	150
ATG CAT AGC CTC TGG AAA GGC ACA CTC CCC GAG CAG ATT TTC GCC CCC	528
Met His Ser Leu Trp Lys Gly Thr Leu Pro Glu Gln Ile Phe Ala Pro	
165	170
GCC CCA CCA GTT CCG GGG TCA TCG CCG CAG GCA ATT TCC GAG TAC CTG	576
Ala Pro Pro Val Arg Gly Ser Ser Pro Gln Ala Ile Ser Glu Tyr Leu	
180	185
CAC AGC ATG GAA TTG CTT ATC GAC GAG ACC GTC TCC GCA ATC ATC ATC	624
His Ser Met Glu Leu Leu Ile Asp Glu Thr Val Ser Ala Ile Ile Ile	
195	200
GAA CCG ATC GTC CAA GGC GCT GGA GGC ATG CGC TTT CAC GAT GTC GCA	672
Glu Pro Ile Val Gln Gly Ala Gly Gly Met Arg Phe His Asp Val Ala	
210	215
CTC ATT GAA GGA GTC CCG GCA CTG TGC AAG AAG CAC GAT CGT TTC TTG	720
Leu Ile Glu Gly Val Ala Ala Leu Cys Lys Lys His Asp Arg Phe Leu	
225	230
ATC GTC GAT GAA ATT GCC ACC GGT TTC GGC CGC ACC GGT GAA CTA TTT	768
Ile Val Asp Glu Ile Ala Thr Gly Phe Gly Arg Thr Gly Glu Leu Phe	
245	250
GCC ACG TTA AGC AAT GGC GTA CAA CCA GAC ATC ATG TGT GTG GGC AAG	816
Ala Thr Leu Ser Asn Gly Val Gln Pro Asp Ile Met Cys Val Gly Lys	
260	265
GCC CTC ACC GGT GGA TTC ATG TCT TTT GCC GCC ACT GTA TGC ACG GAC	864
Ala Leu Thr Gly Gly Phe Met Ser Phe Ala Ala Thr Val Cys Thr Asp	
275	280
AAG GTG GCT CAA TTG ATC AGA TCC CCA GAA GGC GGA GGT GTG CTG ATG	912
Lys Val Ala Gln Leu Ile Arg Ser Pro Glu Gly Gly Gly Val Leu Met	
290	295
CAT GGC CCC ACC TTT ATG GCT AAT CCT CTG GCC TGT GAG GTT TCG CAC	960
His Gly Pro Thr Phe Met Ala Asn Pro Leu Ala Cys Glu Val Ser His	
305	310
GCT TCG CTA GAA ATC ATT GAG ACC GGC ATG TGG CAG AAA CAG GTT AAA	1008
Ala Ser Leu Glu Ile Ile Glu Thr Gly Met Trp Gln Lys Gln Val Lys	
325	330
AAA ATC GAA GCC AAA CTT ATC GCA GGC CTT TCC CCA CTT CGA TGT ATT	1056
Lys Ile Glu Ala Lys Leu Ile Ala Gly Leu Ser Pro Leu Arg Cys Ile	
340	345
CCA GGA GTT GCC GAT GTC CGG GTT CTC GGC GCG ATT GGC GTC ATC GAA	1104
Pro Gly Val Ala Asp Val Arg Val Leu Gly Ala Ile Gly Val Ile Glu	

15  
 355 360 365  
 ATG GAA CAA AAT GTG AAT GTC GAA GAA GCC ACT CAG GCT GCA TTA GAT 1152  
 Met Glu Gln Asn Val Asn Val Glu Glu Ala Thr Gln Ala Ala Leu Asp  
 370 375 380  
 CAC GGT GTG TGG ATC CGC CCC TTT GGA CGC TTG CTC TAT GTC ATG CCC 1200  
 His Gly Val Trp Ile Arg Pro Phe Gly Arg Leu Leu Tyr Val Met Pro  
 385 390 395 400  
 CCA TAT ATC ACC ACG TCA GAG CAA TGC GCA CAG ATC TGC CGC GCG CTT 1248  
 Pro Tyr Ile Thr Thr Ser Glu Gln Cys Ala Gln Ile Cys Arg Ala Leu  
 405 410 415  
 CAT GCT GCA GTT AAA GGA AAA TAA 1272  
 His Ala Ala Val Lys Gly Lys  
 420

## 配列番号: 2

ATG CCA TTT TTA TTT GTC AGC GGC ACC GGA ACC GGG GTT GGA AAG ACC 48  
 Met Pro Phe Leu Phe Val Ser Gly Thr Gly Thr Gly Val Gly Lys Thr  
 1 5 10 15  
 TTC TCC ACA GCC GTT TTG GTT CGT TAC TTA GCC GAT CAA GGA CAC GAT 96  
 Phe Ser Thr Ala Val Leu Val Arg Tyr Leu Ala Asp Gln Gly His Asp  
 20 25 30  
 GTT CTG CCC GTA AAG CTC GTC CAA ACA GGT GAA CTT CCA GCC GAA GGA 144  
 Val Leu Pro Val Lys Leu Val Gln Thr Gly Glu Leu Pro Gly Glu Gly  
 35 40 45  
 GAC ATC TTC ACC ATT GAA CGC TTG ACT GGA ATT GCT GGA GAG GAA TTT 192  
 Asp Ile Phe Thr Ile Glu Arg Leu Thr Gly Ile Ala Gly Glu Glu Phe  
 50 55 60  
 GCT CGT TTC AAA GAC CCT CTT GCG CCA AAT CTG GCA GCC CGA CGA GAG 240  
 Ala Arg Phe Lys Asp Pro Leu Ala Pro Asn Leu Ala Ala Arg Arg Glu  
 65 70 75 80  
 GGG ATC GAG CCA ATA CAG TTT GAT CAG ATT ATC TCG TGG CTT CGT GGT 288  
 Gly Ile Glu Pro Ile Gln Phe Asp Gln Ile Ile Ser Trp Leu Arg Gly  
 85 90 95  
 TTT GAC GAC CCA GAT CGC ATC ATT GTG GTG GAG GGC GCT GGT GGC CTG 336  
 Phe Asp Asp Pro Asp Arg Ile Ile Val Val Glu Gly Ala Gly Gly Leu  
 100 105 110  
 CTG GTC AGA TTA GGG GAA GAT TTC ACC CTG GCA GAT GTT GCC TCC GCT 384  
 Leu Val Arg Leu Gly Glu Asp Phe Thr Leu Ala Asp Val Ala Ser Ala  
 115 120 125  
 TTG AAT GCA CCC TTA GTG ATT TGG ACA AGC ACC GGA TTG GGA AGC CTC 432  
 Leu Asn Ala Pro Leu Val Ile Trp Thr Ser Thr Gly Leu Gly Ser Leu  
 130 135 140  
 AAC GCT GCT GAA TTA AGC GTT GAG GCA GCA AAC CGC CGA GGA CTC ACA 480  
 Asn Ala Ala Glu Leu Ser Val Glu Ala Ala Asn Arg Arg Gly Leu Thr  
 145 150 155 160  
 GTG TTG GGA GTC CTC GGC GGT TCG ATC CCT CAA AAT CCT GAT CTA GCT 528  
 Val Leu Gly Val Leu Gly Gly Ser Ile Pro Gln Asn Pro Asp Leu Ala  
 165 170 175  
 ACG ATG CTT AAT CTC GAA GAA TTT GAG AGA GTC ACC GGC GTG CCC TTT 576  
 Thr Met Leu Asn Leu Glu Glu Phe Glu Arg Val Thr Gly Val Pro Phe  
 180 185 190

17  
 TGG GGA GCT TTG CCG GAA GGG TTG TCA CGG GTG GAG GGG TTC GTC GAA 624  
 Trp Gly Ala Leu Pro Glu Gly Leu Ser Arg Val Glu Gly Phe Val Glu  
 195 200 205  
 AAG CAA TCT TTT CCG GCC CTT GAT GCC TTT AAG AAA CCG CCG GCA AGG 672  
 Lys Gln Ser Phe Pro Ala Leu Asp Ala Phe Lys Lys Pro Pro Ala Arg  
 210 215 220  
 TGA 675

上記の塩基配列を包含して成る本発明のジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及び／又はデスチオピオチンシンセターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片は、天然のコリネ型細菌染色体DNAから分離されたもののみならず、通常用いられるDNA合成装置、例えばベックマン社製System-IPlusを用いて合成されたものであつてもよい。

【0032】また前記の如くプレバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体DNAから取得される本発明のDNA断片は、ジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及び／又はデスチオピオチンシンセターゼをコードする機能を実質的に損なうことがない限り、塩基配列の一部の塩基が他の塩基と置換されていてもよく又は削除されていてもよく、或いは新たに塩基が挿入されていてもよく、さらに塩基配列の一部が転位されているものであつてもよく、これらの誘導体のいずれもが、本発明のbioA bioD断片に包含される。

【0033】本発明のbioA bioD断片は、コリネ型細菌でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を少くとも含むプラスミドベクターに導入することにより、コリネ型細菌でジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及び／又はデスチオピオチンシンセターゼの高発現可能な組換えプラスミドを得ることができる。

【0034】本発明のbioA bioD断片を導入することができる、コリネ型細菌内での複製増殖機能を司る遺伝子を少くとも含むプラスミドベクターとしては、特願平2-42122号明細書に開示されているプラスミドpCRY30；特願平2-276575号公報に記載されているプラスミドpCRY21、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY3K7、pCRY3KE、pCRY3KX；特願平1-191686号公報に記載されているプラスミドpCRY2及びpCRY3；特開昭58-67679号公報に記載のpAM330；特開昭58-77895号公報に記載のpHM1519；特開昭58-192900号公報に記載のpAJ655、pAJ611及びpAJ1844；特開昭57-134500号に記載のpCG1；特開昭58-35197号公報に記載のpCG2；特開昭57-183799号公報に記載のpCG4及びpCG11等を挙げることができる。

【0035】これらの中でもコリネ型細菌の宿主ベクター系で用いられるプラスミドベクターとしては、コリネ

型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子とコリネ型細菌内でプラスミドの安定化機能を司る遺伝子とをもつものが好ましく、例えばプラスミドpCRY30、pCRY21、pCRY2KE、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY3K7、pCRY3KE、pCRY3KXが好適に使用される。

【0036】上記プラスミドベクターpCRY30を調製する方法としては、プレバクテリウム・スタチオニス (*Brevibacterium stationis*) IF012144 (FERM BP-2515) からプラスミドpBY503 DNAを抽出 (このプラスミドの詳細は特開平1-95785号公報参照) し、制限酵素XhoIで大きさが約4.0 kbのプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNA断片を切り出し、制限酵素EcoRIおよびKpnIで大きさが約2.1 kbのプラスミドの安定化機能を司る遺伝子を含むDNA断片を切り出す。これらの両断片をプラスミドpHSG298 (宝酒造製) のEcoRI、KpnI部位及びsalI部位に組み込むことにより、プラスミドベクターpCRY30を調製することができる。

【0037】次に、上記プラスミドベクターへの本発明のbioA bioD断片の導入は、例えばプラスミドベクター中に1箇所だけ存在する制限酵素部位を、該制限酵素で開裂し、そこに本発明のbioA bioD断片を、必要に応じてS1ヌクレアーゼで処理して平滑末端とするか、または適当なアダプターDNAの存在下に、DNAリガーゼ処理で連絡させることにより行うことができる。

【0038】具体的には、例えば前記プラスミドpCRY30を制限酵素XhoIで開裂させ、そこに前記制限酵素SalIを用いて切り出すことにより得られる大きさが約4.0 kbのbioA bioD断片を、DNAリガーゼで連絡させることにより行うことができる。

【0039】このようにして造成されるプラスミドpCRY30に本発明の大きさが約4.0 kbのDNA断片を導入した組換えプラスミドは、ジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及びデスチオピオチンシンセターゼの製造に好適に用いることができる組換えプラスミドの一つであり、本発明者らはこれをプラスミドpCRY30-bio3と命名した。プラスミドpCRY30-bio3の造成については、後記実施例3及び4においてさらに詳細に説明する。

19

【0040】このプラスミドpCRY30-bio3の制限酵素切断点地図を図2に示す。このようにして造成されるbioA bioDを含むコリネ型細菌内で複製増殖可能なプラスミドを、宿主微生物に導入し培養することにより、ジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及びデスチオピオチンシンセターゼを安定に効率よく生産することが可能となる。

【0041】本発明によるプラスミドで形質転換しうる宿主微生物としては、コリネ型細菌、例えばプレバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497)、プレバクテリウム・フラバムMJ-233-AB-41 (FERM BP-1498)、プレバクテリウム・フラバムMJ-233-ABT-11 (FERM BP-1500)、プレバクテリウム・フラバムMJ-233-ABD-21 (FERM BP-1499) 等が挙げられる。

【0042】なお、上記のFERM BP-1498の菌株は、FERM BP-1497の菌株を親株としてDL- $\alpha$ -アミノ酪酸耐性を積極的に付与されたエタノール酸化性微生物である (特公昭59-28398号公報第3~4欄参照)。また、FERM BP-1500の菌株は、FERM BP-1497の菌株を親株としたL- $\alpha$ -アミノ酪酸トランスアミナーゼ高活性変異株である (特開昭62-51998号公報参照)。さらに、FERM BP-1499の菌株はFERMBP-1497の菌株を親株としたD- $\alpha$ -アミノ酪酸デアミナーゼ高活性変異株である (特開昭61-177993号公報参照)。

【0043】これらの微生物の他に、プレバクテリウム・アンモニアゲネス (*Brevibacterium ammoniagenes*) ATCC 6871、同ATCC 13745、同ATCC 13746、プレバクテリウム・デバリカタム (*Brevibacterium divaricatum*) ATCC 14020、プレバクテリウム・ラクトファーメンタム (*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC 13869、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 31831等を宿主微生物として用いることもできる。

【0044】なお宿主としてプレバクテリウム・フラバムMJ-233由来の菌株を用いる場合、本菌株が保有するプラスミドpBY502 (特開昭63-36787号公報参照) のため、形質転換が困難である場合があるので、そのような場合には、本菌株よりプラスミドpBY502を除去することが望ましい。そのようなプラスミドpBY502を除去する方法としては、例えば、継代培養を繰り返すことにより、自然に欠失させることも可能であるし、人為的に除去することも可能である (Bact. Rev. 36 p. 361~405 (1972)参照)。上記プラスミドpBY502を人為的に除去する方法の一例を示せば次のとおりである。

20

【0045】宿主プレバクテリウム・フラバムMJ-233の生育を不完全に阻害する濃度のアクリジンオレンジ (濃度: 0.2~50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) もしくはエチジウムブロミド (濃度: 0.2~50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 等を含む培地に、1ml当り約10細胞になるように植菌し、生育を不完全に阻害しながら、約24時間約35℃で培養する。培養液を希釈後寒天培地に塗布し、約35℃で約2日培養する。出現したコロニーから各々独立にプラスミド抽出操作を行い、プラスミドpBY502が除去されている株を選択する。この操作によりプラスミドpBY502が除去されたプレバクテリウム・フラバムMJ-233由来菌株が得られる。

【0046】このようにして得られるプレバクテリウム・フラバムMJ-233由来菌株への前記プラスミドの形質転換法としては、DNA受容菌にパルス波を通电することによりプラスミドを導入することが可能である [Satoh, Y. et al, Journal of Industrial Microbiology, 5, 159(1990)参照]。

【0047】上記の方法で形質転換して得られるジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及び/又はデスチオピオチンシンセターゼ産生能を有するコリネ型細菌、例えばプレバクテリウム・フラバムMJ-233由来株の培養方法を以下に述べる。

【0048】培養は炭素源、窒素源、無機塩等を含む通常の栄養培地で行なうことができ、炭素源としては、例えばグルコース、エタノール、メタノール、乳糖蜜等が、そして窒素源としては、例えばアンモニア、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、尿素等がそれぞれ単独もしくは混合して用いられる。また無機塩としては、例えばリン酸一水素カリウム、リン酸二水素カリウム、硫酸マグネシウム等が用いられる。この他にペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステアープリカー、カザミノ酸、ピオチン等の各種ビタミン等の栄養素を培地に添加することができる。

【0049】培養は、通常、電気攪拌、振とう等の好気的条件下に、約20~40℃、好ましくは25~35℃の温度で行うことができる。培養途中のpHは5~10、好ましくは7~8付近で行い、培養中のpHの調整は酸又はアルカリを添加して行うことができる。

【0050】培養開始時の炭素源濃度は、好ましくは1~5容量%、更に好ましくは2~3容量%である。また、培養期間は通常1~7日間とすることができ、最適期間は3日間である。

【0051】このようにして得られる培養物から遠心分離等により菌体を取得することができる。

【0052】かくして培養された菌体は、野生株を培養した場合に比べてジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及び/又はデスチオピオチンシンセターゼをその菌体内に多量に含有している。

【0053】菌体内に産生された、ジアミノペラルゴン

酸アミノトランスフェラーゼ及びデスチオピオチンシンセターゼの含量を調べる方法としては、例えば超音波処理、酵素処理、ホモジナイズ等の通常用いられる手段にて破砕し得られる無細胞抽出液を、SDSゲル電気泳動法【例えば、「蛋白質・酵素の基礎実験法」南江堂刊、314～333頁等参照】に付することにより、菌体内の蛋白質を分離した後、Coomassie Brilliant Blue R-250による染色法あるいは、銀染色法により染色した後、例えばファルマシア社製 Ultro Scan XL レーザードンシトメーターを用いることにより、菌体中の各種タンパク質を測定することができる。かくして、菌体内に産生された、ジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及び/又はデスチオピオチンシンセターゼ含量の増加を測定することが可能である。

【0054】上記の如くジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及び/又はデスチオピオチンシンセターゼを高含量含む菌体を用い、少なくともケトアミノペラルゴン酸を含有する前記通常の培養培地で培養することにより、高効率でピオチンを製造することができる。

【0055】本明細書では、プレバクテリウム・フラバムMJ-233からジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及びデスチオピオチンシンセターゼをコードする遺伝子(bioA bioD)を含むDNA断片を単離し、該DNA断片を導入した組換えプラスミドを同じくプレバクテリウム・フラバムMJ-233由来株へ導入し、該微生物によるジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及び/又はデスチオピオチンシンセターゼの生産能の向上について主として例示したが、プレバクテリウム・フラバムMJ-233由来株の代りに他のコリネ型細菌を用いても本発明の目的は達成される。

【0056】いわゆるコリネ型細菌は、コリネバクテリウム属やプレバクテリウム属等の種々の属名、種々の菌名が付されているが主な菌学的性質を同じくしている。これらの菌群は、細胞壁のアミノ酸構成やDNAの塩基組成が画一的であり、菌種間には70～80%のDNAの相同性があり、非常に近縁な微生物であることは明らかである(Report of the Fermentation Research Institutes No. 55, P.1-5, 1980, International Journal of Systematic Bacteriology Vol. 31, P.131-138, 1981参照)。

【0057】また、ピオチン要求性のコリネ型細菌、例えばプレバクテリウム・フラバムMJ-233(FERM BP-1497)、プレバクテリウム・ラクトファーマンタムATCC13869およびコリネバクテリウム・グルタミカムATCC31831について、ピオチン合成に関与する各ステップの遺伝子が欠損したピオチン要求性大腸菌変異株(Journal of Bacteriology, vol 112, p830-839, 1972およびJournal of Bacteriology, vol 94, p2065-2066, 1967参照)との交差相補

性試験(Journal Bacteriology, vol 96, p515-524, 1968参照)により、そのピオチン合成系路について検討した結果、これら3種の菌株は同様にピメリルCoAシンセターゼをコードする遺伝子(bioC)および7-ケト-8-アミノペラルゴン酸シンセターゼをコードする遺伝子(bioF)が欠損しており、また少なくとも7, 8-ジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼをコードする遺伝子(bioA)、デスチオピオチンシンセターゼをコードする遺伝子(bioD)およびピオチンシンセターゼをコードする遺伝子(bioB)を保有していることが明らかとなった。

【0058】これらの事実を踏まえれば、プレバクテリウム・フラバムMJ-233のみならず、コリネ型細菌全般から単離されたジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及び/又はデスチオピオチンシンセターゼをコードする遺伝子(bioA及び/又はbioD)を含むDNA断片も本発明の範囲に含まれ、また、本発明のプラスミドで形質転換し得る宿主微生物は、プレバクテリウム・フラバムMJ-233に限らず、コリネ型細菌が全て含まれることは明らかである。

【0059】

【実施例】以上に本発明を説明してきたが、下記の実施例によりさらに具体的に説明する。しかしながら、実施例は本発明の具体的に認識を得る一助とみなすべきものであり、本発明の範囲を限定するためのものではないことを理解しなければならない。

【0060】

【実施例1】コリネ型細菌とピオチン要求性大腸菌変異株との相補性試験

(A) コリネ型細菌を含有するピオチン欠乏最少培地プレート

の作成  
半合成培地A培地(組成: 尿素2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  7g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5g、 $\text{MgSO}_4$  0.5g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  6mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 6\text{H}_2\text{O}$  6mg、酵母エキス2.5g、カザミノ酸5g、ピオチン200 $\mu\text{g}$ 、塩酸チアミン200 $\mu\text{g}$ 、グルコース20g、純水1リットル) 1リットルに、プレバクテリウム・フラバムMJ-233(FERM BP-1497)を接種してO.D. が約2.9になるまで培養し、菌体を集めた。得られた菌体をBM緩衝液[組成: 尿素2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  7g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5g、 $\text{MgSO}_4$  0.5g]で2回洗浄した。この菌体を10mlのBM緩衝液に懸濁し、その内1mlを、滅菌後、50℃に放置しておいたピオチン検定用C培地(尿素0.2%、硫酸アンモニウム0.7%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05%、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.05%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  6ppm、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 6\text{H}_2\text{O}$  6ppm、チアミン $\cdot \text{HCl}$  100 $\mu\text{g}$ /リットル、ビタミン $\cdot \text{A}$  ツセイ用カザミノ酸0.1%、グルコース0.2%、寒天

1.0%)に添加し、攪拌後、プレートに流し、固化した。

【0061】同様に、プレバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497)の代わりに、プレバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC 13869、あるいは、コリネバクテリウム・グルタミカムATCC 31831を用いて各種のコリネ型細菌を含んだビオチン欠乏最少培地プレートを作製した。

(B) ビオチン要求性大腸菌変異株との相補性試験  
ビオチン生合成系の各ステップの欠損したビオチン要求性大腸菌変異株と各種コリネ型細菌との相補性試験により、各種コリネ型細菌のビオチン生合成系を推定することができる。

【0062】上記(A)項で作製した、3種のコリネ型細菌含有ビオチン欠乏最少培地のプレートに、各種ビオチン要求性大腸菌変異株を線状に植菌した。用いたビオチン要求性大腸菌変異株は、エシエリヒア・コリ (Escherichia Coli) R873 (bioA4)、同R874 (bioF12)、同R875 (bioB17)、同R876 (bioC18)、同R877 (bioD19) である〔( )内は各菌株の遺伝子型 (Genotype)を示す、またこれらの菌株の詳細および取得方法については、Journal of Bacteriology, vol 94, p2065-2066 (1972)、Journal of Bacteriology, vol 112, p830-839 (1972) 参照〕。

【0063】これらのビオチン要求性大腸菌変異株とコリネ型細菌が相補した場合は、コリネ型細菌がビオチン欠乏最少培地のプレート中に生育し、黄色いコロニーを形成する。各種ビオチン要求性大腸菌変異株に対応するコリネ型細菌のコロニー形成の有無により、コリネ型細菌がビオチン生合成に関与する遺伝子のどの部分を欠損し、どの部分を保有しているか容易に判別することができる。

【0064】本相補試験の結果、プレバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497)、プレバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC 13869、コリネバクテリウム・グルタミカムATCC 31831は、各菌株共、エシエリヒア・コリR873 (bioA4)、同R875 (bioB17)、同R877 (bioD19)を相補したが、同R874 (bioF12)、同R876 (bioC18)を相補しなかった。即ち、各々のコリネ型細菌は、少なくとも、同様に7、8-ジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼをコードする遺伝子 (bioA)、デスチオビオチンシンセターゼをコードする遺伝子 (bioD) およびビオチンシンセターゼをコードする遺伝子 (bioB)を有していることが明らかとなった。

【0065】

【実施例2】プレバクテリウム・フラバムMJ-233由来のジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラー

ゼ及びデスチオビオチンシンセターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片 (bioA bioD断片) のクローニング

(A) プレバクテリウム・フラバムMJ-233の全DNAの抽出

半合成培地A培地 [組成: 尿素2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  7g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5g、 $\text{MgSO}_4$  0.5g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  6mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 6\text{H}_2\text{O}$  6mg、酵母エキス2.5g、カザミノ酸5g、ビオチン200 $\mu\text{g}$ 、塩酸チアミン200 $\mu\text{g}$ 、グルコース20g、純水1リットル] 1リットルに、プレバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497)を対数増殖期後期で培養し、菌体を集めた。得られた菌体を10mg/mlの濃度にリゾチームを含む10mM NaCl-20mM トリス緩衝液 (pH 8.0) - 1mM EDTA-2Na溶液15mlに懸濁した。次にプロテナーゼKを、最終濃度が100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように添加し、37℃で1時間保温した。さらにドデシル硫酸ナトリウムを最終濃度が0.5%になるように添加し、50℃で6時間保温して容菌した。この溶菌液に、等量のフェノール/クロロホルム溶液を添加し、室温で10分間ゆるやかに振とうした後、全量を遠心分離 (5,000 $\times$ g、20分間、10 $\sim$ 12℃) し、上清画分を分取し、酢酸ナトリウムを0.3Mとなるように添加した後、2倍量のエタノールをゆつくりと加えた。水層とエタノール層の間に存在するDNAをガラス棒でまきとり、70%エタノールで洗浄した後、風乾した。得られたDNAに10mM トリス緩衝液 (pH 7.5) - 1mM EDTA-2Na溶液5mlを加え、4℃で一晩静置し、以後の実験に用いた。

【0066】(B) 組換え体の創製

上記(A)項で得たプレバクテリウム・フラバムMJ-233の全DNA 90 $\mu\text{l}$ を制限酵素Sau 3A 1 unitを用い、37℃で20分間反応させ部分分解した。この部分分解DNAにコスミドpWE15 (ストラタジーン社製)を制限酵素BamHIで切断した後、脱リン酸化処理したものを混合し、50mM トリス緩衝液 (pH 7.6)、10mM ジチオスレイトール、1mM ATP、10mM  $\text{MgCl}_2$ 及びT4 DNAリガーゼ1 unitの各成分を添加し (各成分の濃度は最終濃度である)、4℃で15時間反応させ、結合させた。

【0067】(C) ビオチン生合成に関与する酵素をコードする遺伝子を含むコスミドの選抜

上記(B)項で得たコスミド混液を用い、前記エシエリヒア・コリR873 (bioA4)株を形質導入し、アンピシリン50mgを含む選択培地 [ $\text{K}_2\text{HPO}_4$  7g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1g、カザミノ酸10g、グルコース2g及び寒天16gを蒸留水1リットルに溶解]に塗抹した。なお形質導入には、宝酒造より販売されている入DN

A invitro Packaging Kit を用いて行つた。培地上の生育株を常法により、液体培養し、培養液よりコスミドDNAを抽出し、該コスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、コスミドpWE15の長さ8.8kbのDNA断片に加え、長さ約30kbのDNA断片が認められた。本コスミドをpWE15-bioAと命名した。

【0068】(D) bioA bioD断片のプラスミドpBluescript I Iへのサブクローニング

上記(C)項で得たコスミドpWE15-bioAに含まれるDNA挿入断片は約30kbと大きく、実用的でないで、得られた断片のうち必要な部分だけに小型化するために、プラスミドpBluescript I I (ストラタジーン社より市販)ヘジアミノベラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及びデスチオピオチンシンセターゼをコードする遺伝子(bioA bioD)を含むDNA断片を下記のとおりサブクローニングした。

【0069】上記(C)項で得たコスミドpWE15-bioAを制限酵素Sal Iで切断したものと、プラスミドpBluescript I Iを制限酵素Sal Iで切断したものを混合し、50mMトリス緩衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mMATP、10mMMgCl<sub>2</sub>及びT4DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、12℃で15時間反応させ、結合させた。

【0070】得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法(Journal of Molecular Biology, 53, 159, 1970)に従いエシエリヒア・コリR873(bioA4)株を形質転換し、アンピシリン50mgを含む選択培地[K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1g, MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.1g, カザミノ酸\*

表3 プラスミドpBS-bioAD4

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ(kb)
HindIII	1	6.95
Xho I	2	4.25, 2.7
BamHI	2	3.75, 3.2

上記の制限酵素により特徴づけられるプラスミドをpBS-bioAD4と命名した。

【0074】以上の結果より、制限酵素Sal Iで切り出される、ジアミノベラルゴン酸アミノトランスフェラーゼとデスチオピオチンシンセターゼをコードする遺伝子を含む長さ4.0kbのDNA断片を得ることができた。

【0075】

【実施例3】bioA及びbioDの塩基配列の決定

(A) デレーションミュータントの作製

実施例2の(C)項で得られたプラスミドpBS-bioAD4 30μgを制限酵素Xba Iを用いて、37℃、1時間反応により切断した。この反応液を75℃で15分間加熱して、制限酵素を失活させたのち、1mH

\*10g、グルコース2g及び寒天16gを蒸留水1リットルに溶解]に塗抹した。

【0071】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpBluescript I Iの長さ3.95kbのDNA断片に加え、長さ4.0kbの挿入DNA断片が認められた。このプラスミドを用い、上記方法に従い前記エシエリヒア・コリR877(bioD19)株を形質転換し、アンピシリン50mgを含む選択培地[K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1g, MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.1g, カザミノ酸10g、グルコース2g及び寒天16gを蒸留水1リットルに溶解]に塗抹した。

【0072】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、エシエリヒア・コリR873(bioA4)株の形質転換体から得られたプラスミドと全く同様に、プラスミドpBluescript I Iの長さ2.95kbのDNA断片に加え、長さ約4.0kbの挿入DNA断片が認められた。長さ約4.0kbのDNA断片を各種の制限酵素で切断したときの制限酵素認識部位数および切断断片の大きさは、前記表1に示したとおりであった。このDNA断片の制限酵素切断点地図を図1に示す。また上記で得られたプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の表3に示す。

【0073】

【表4】

thio-dNTPを2μl、クレーン断片(klenow fragment) 5unitsを加え室温で10分間反応させた。反応液と同量のフェノール/クロロホルム(1:1)で切断断片を抽出したのち、2.5倍量のエタノールを加えDNAを沈殿させた。遠心分離後、真空乾燥し、DNAを回収した。このDNAを溶解し、制限酵素EcoRIで37℃1時間反応により切断した。この溶液から同量のフェノール/クロロホルム(1:1)でDNAを抽出したのち、2.5倍量のエタノールを加えDNAを沈殿させ、遠心分離後、真空乾燥し、DNAを回収した。

【0076】得られたDNAを100μlのExo I Iバッファー[50mM Tris-HCl pH8.0、100mM NaCl、5mM MgCl<sub>2</sub>、10mM β-メルカプトエタノール]に溶解した。このDNA溶液に

27

180unitsのエキソヌクレアーゼIIIを加えボルテックスにてかくはんし、37℃にてインキュベートした。この溶液を1分毎に10μlずつサンプリングし、予め準備した100μlのMBヌクレアーゼバッファー(40mM酢酸ナトリウムpH4.5、100mM NaCl、10%グリセロール)中へ順次加え、65℃、5分間の処理によりエキソヌクレアーゼIIIを失活させたのち37℃にもどし、50unitsのMung Beanヌクレアーゼを加え30分間インキュベートした。同量の10mM Tris-HCl-1mM EDTA飽和フェノールで1回上清をクロロホルム/イソamilアルコール(24:1)で1回、DNAをそれぞれ抽出した。上清を別のチューブに移し、2.5倍量のエタノールを加え遠心分離にて沈殿を回収し、70%エタノールで洗浄したのち真空乾燥した。

【0077】得られたDNAを、50μlのクレノー(Klenow)がバッファー[7mM Tris-HCl pH7.5、0.1mM EDTA、20mM NaCl、7mM MgCl<sub>2</sub>、0.1mM dNTPs]に溶解させた後、2unitsのクレノー断片を加え、37℃、15分間インキュベートした。この溶液に2.5倍量のエタノールを加え、遠心分離にて沈殿を回収し、70%エタノールで洗浄後、真空乾燥した。

【0078】得られた沈殿を40μlのTEバッファーに溶解し、10mM ジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl<sub>2</sub>およびT4リガーゼ5unitsの各成分を添加し、12℃で15時間反応させ結合させた。

【0079】得られたDNAミクスチャーを用い、エシエリヒア・コリJH109(宝酒造製)を形質転換し、アンピシリン(50mg/ml)を含むLB培地[10g Tryptone, 5g Yeast Extract, 5g NaCl 16g agar per 1l]に塗抹した。

【0080】生育したコロニーよりプラスミドを抽出し、インサートDNAの大きさをしらべ、インサートの大きさが200bp~4kbまで約250bpおきに20クローンを選抜した。

【0081】同様にして逆方向のクローンについても20クローン選抜した。

【0082】(B) デレーションミュータントによる大腸菌変異株の相補性試験

上記(A)項で得たデレーションミュータントプラスミドを、実施例1の(D)項に示す方法に従ってエシエリヒア・コリR873(b10A4)株およびR877株(b10D<sub>1</sub>)を形質転換し、アンピシリン50mgを含む選択培地[K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1g、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.1g、カザミノ酸10g、グルコース2g及び寒天16gを蒸留水1lに溶解]に塗抹した。

【0083】この培地上への、変異株の生育を見ることにより、デレーションミュータントDNA断片による、

28

変異株の相補性を調べた。その結果を図2に示す4.0kbのDNA断片のうち、右側末端の約2.4kbのDNA断片上に左からb10A、b10Dの順に各々遺伝情報がコードされていることが明らかになった。

【0084】(C) ジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼをコードする遺伝子(b10A)の塩基配列の決定

実施例2の(D)項で得られた、ジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及びデスチオピオチンシンセターゼをコードする遺伝子(b10A及びb10D)を含む長さ約4.0kbの図2に示すDNA断片のうち、右側末端の約2.4kbのDNA断片について、実施例3の(A)項で得られた40クローンのデレーションミュータントからさらに選抜した17クローン(図2中にて示す)を使って、その塩基配列をM13ファージを用いる、ダイデオキシヌクレオチド酵素法(dideoxy chain termination法)(Sanger, F. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 5463, 1977)により決定した。

【0085】その塩基配列中には、図1の切断点地図に示したSacI上流からDraII、BamHIの方向に向って一つの大きなオープンリーディングフレームと、BamHI下流からSalIの方向に向ってもう一つのオープンリーディングフレームが存在していた。

【0086】この二つのオープンリーディングフレームのうち、SacI部位の133~131塩基上流の翻訳開始コドンから始まるオープンリーディングフレームの存在から、ジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼをコードする遺伝子(b10A)は、前記配列番号1で示した塩基配列を有する423のアミノ酸をコードする1269の塩基対より構成されていることが明らかとなった。

【0087】また、BamHI部位の113~115塩基下流の翻訳開始コドンATGに続いて224のコドンがつながっているオープンリーディングフレームの存在から、デスチオピオチンシンセターゼをコードする遺伝子(b10D)は、前記配列番号2で示した塩基配列を有する224のアミノ酸をコードする672の塩基対より構成されていることが明らかとなった。

【0088】

【実施例4】コリネ型細菌内で複製した安定プラスミドベクターpCRY30の作成

(A) プラスミドpBY503の調製

プラスミドpBY503は、プレバクテリウム・スタチオニスIF012144(FERM BP-2515)から分離された分子量約10メガダルトンのプラスミドであり、特開平1-95785号公報に記載のようにして調製した。半合成培地A培地[尿素2g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5g、MgSO<sub>4</sub> 0.5g、FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O



6mg、 $MnSO_4 \cdot 4 \sim 6H_2O$  6mg、酵母エキス2.5g、カザミノ酸5g、ビオチン200 $\mu$ g、塩酸チアミン200 $\mu$ g、グルコース20g及び純水1リットル] 1リットルに、*プレバクテリウム・スタチオニス* 1F012144を対数増殖期後期まで培養し、菌体を集めた。得られた菌体を10mg/mlの濃度にリゾチームを含む緩衝液[25mMトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、10mMのEDTA、50mMグルコース] 20mlに懸濁し、37℃で1時間反応させた。反応液にアルカリ-SDS液[0.2N NaOH、1% (W/V) SDS] 40mlを添加し、緩やかに混和して室温にて15分間静置した。次に、この反応液に酢酸カリウム溶液[5M酢酸カリウム溶液60ml、酢酸11.5ml、純水28.5mlの混合液] 30mlを添加し、充分混和してから氷水中に15分間静置した。

【0089】溶菌物全量を遠心管に移し、4℃で10分間、15,000 $\times$ gの遠心分離にかけ、上澄液を得た。

【0090】これに等量のフェノール-クロロホルム液(フェノール:クロロホルム=1:1混和液)を加え懸濁した後、遠心管に移し、室温下で5分間、15,000 $\times$ gの遠心分離にかけ、水層を回収した。水層に2倍量のエタノールを加え、-20℃で1時間静置後、4℃で10分間、15,000 $\times$ gの遠心分離にかけ、沈澱を回収した。

【0091】沈澱を減圧乾燥後、TE緩衝液[トリス10mM、EDTA1mM、HClにてpH8.0に調整] 2mlに溶解した。溶解液に塩化セシウム溶液[5倍濃度のTE緩衝液100mlに塩化セシウム170gを溶解させた液] 15mlと10mg/mlエチジウムブロマイド溶液1mlを加えて、密度を1.392g/mlに合わせた。この溶液を12℃で42時間、116,000 $\times$ gの遠心分離を行った。

【0092】プラスミドpBY503は紫外線照射により遠心管内で下方のバンドとして見出しされる。このバンドを注射器で遠心管の側面から抜きとることにより、プラスミドpBY503を含む分画液を得た。

【0093】次いでこの分画液を等量のイソアミルアルコールで4回処理してエチジウムブロマイドを抽出除去し、その後TE緩衝液に対して透析を行った。このようにして得られたプラスミドpBY503を含む透析液に3M酢酸ナトリウム溶液を最終濃度30mMに添加した後、2倍量エタノールを加え、-20℃1時間静置した。この溶液を15,000 $\times$ gの遠心分離にかけてDNAを沈降させ、プラスミドpBY503を50 $\mu$ g得た。

【0094】(B) プラスミドベクターpCRY30の作成

プラスミドpHSG298(宝酒造製) 0.5 $\mu$ gに制限酵素SalI(5unit)を37℃1時間反応させ、プラ

スミドDNAを完全に分解した。

【0095】前記(A)項で調製したプラスミドpBY503の2 $\mu$ gに制限酵素XhoI(1unit)を37℃で30分間反応させ、プラスミドDNAを部分分解した。

【0096】両者のプラスミドDNA分解物を混合し、制限酵素を不活性化するために65℃で10分間加熱処理した後、該失活溶液中の成分が最終濃度として各々50mMトリス緩衝液pH7.6、10mM MgCl<sub>2</sub>、10mMジチオスレイトール、1mM ATP及びT4DNAリガーゼ1unitになるように各成分を強化し、16℃で15時間保温した。この溶液を用いてエシエリヒア・コリJM109コンピテントセル(宝酒造製)を形質転換した。

【0097】形質転換株は30 $\mu$ g/ml(最終濃度)のカナマイシン、100 $\mu$ g/ml(最終濃度)のIPTG(イソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド)、100 $\mu$ g/ml(最終濃度)のX-gal(5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド)を含むL培地(トリプトン10g、酵母エキス5g、NaCl5g及び純水1リットル、pH7.2)で37℃にて24時間培養し、生育株として得られた。これらの生育株のうち、白いコロニーで生育してきたものを選択し、各々プラスミドをアルカリ-SDS法[T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook, "Molecular cloning" (1982) p90-91参照]により抽出した。

【0098】その結果、プラスミドpHSG298のSalI部位にプラスミドpBY503由来の約4.0kbの断片が挿入されたプラスミドpHSG298-oriが得られた。

【0099】次の同様の方法を用い、前記(A)項で得られたプラスミドpBY503DNAを制限酵素KpnI及びEcoRIにて処理して得られる約2.1kbのDNA断片を上記プラスミドpHSG298-oriのKpnI及びEcoRI部位にクローニングし、プラスミドベクターpCRY30を調製した。

【0100】

【実施例5】プラスミドpCRY30-b1o3の作成及びコリネ型細菌への導入

実施例2で得られたプラスミドpBS-b1oAD4の5 $\mu$ gを制限酵素SalIを5unit用いて37℃で1時間反応させ分解したものと、実施例3で得られたプラスミドpCRY30の1 $\mu$ gを制限酵素XhoIの1unitを用いて37℃で1時間反応させ分解したものを混合し、50mMトリス緩衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl<sub>2</sub>およびT4DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、12℃で15時間反応させ結合させた。このプラスミドを用いて前記方法に従いエシエリヒア・コリR873(b1oA4)株を形質転換し、カナマイシン50 $\mu$ g/mlを含む選択培地[K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

7 g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g、カザミノ酸10 g、グルコース2 g及び寒天16 gを蒸留水1リットルに溶解]に塗抹した。

【0101】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpCRY30の長さ8.6 kbのDNA断片に加え、長さ4.0 kbの挿入DNA断片が認められた。

【0102】上記の如く調製されたプラスミドDNAをコリネ型細菌へ形質転換した。

【0103】形質転換は、電気パルス法を用いて行った。プレバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497) プラスミドpBY502除去株を100 mlの前記A培地で対数増殖初期まで培養し、ペニシリンGを1ユニット/mlになるように添加して、さらに2時間振とう培養し、遠心分離により菌体を集め、\*

表4 プラスミドpCRY30-b103

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
BamHI	2	1.1, 3.9
EcoRI	1	12.6
KpnI	1	12.6
SacI	2	2.5, 10.1
SalI	2	0.4, 12.2
XhoI	1	12.6

上記制限酵素により特徴づけられるプラスミドをpCRY30-b103と命名した。このプラスミドの制限酵素切断点地図を図2に示す。

【0105】なお、プラスミドpCRY30-b103により形質転換されたプレバクテリウム・フラバムMJ233-B103は、茨城県つくば市東1丁目1番3号の工業技術院微生物工業技術研究所に、平成3年2月26日付で：微工研菌寄第12041号 (FERM P-12041) として寄託されている。

【0106】

【実施例6】プラスミドpCRY30-b103の安定性

前記のA培地100 mlを500 ml容三角フラスコに分注し、120℃で15分間滅菌処理したものに、実施例4で得た形質転換プレバクテリウム・フラバムMJ233-B103を植菌し、30℃にて24時間振とう培養を行った後、同様に調製したA培地100 mlを500 ml容三角フラスコに分注し、120℃で15分間滅菌したもの、1 ml当たり50 cellsの割合になるように植菌し、同じく30℃にて24時間振とう培養を行った。次に遠心分離して集菌し、菌体を洗浄後、カナマイシンを50 µg/mlの割合で添加したA培地及び無添加のA培地を用いて調製した平板培地に一定量塗抹し、30℃にて1日培養後生育コロニーをカウントした。

\*菌体を20 mlのバルス用溶液 (272 mM Sucrose, 7 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$ ; pH 7.4) にて洗浄した。さらに菌体を遠心分離して集め、5 mlのバルス用溶液に懸濁し、0.75 mlの細胞と、前記で得られたプラスミドDNA溶液50 µlとを混合し、水中にて20分間静置した。ジーンバルサー (バイオラド社製) を用いて、2500 ボルト、25 µFDに設定し、パルスを印加後水中に20分間静置した。全量を3 mlの前記A培地に移し30℃にて1時間培養後、カナマイシン15 µg/ml (最終濃度) を含む前記A寒天培地に植菌し30℃で2~3日間培養した。出現したカナマイシン耐性株より、前記実施例2 (A) 項に記載の方法を用いてプラスミドを得た。このプラスミドを各種制限酵素で切断し、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の表4に示す。

【0104】

【表5】

【0107】この結果、カナマイシン添加および無添加培地に生育したコロニーは同数であること、さらにA培地生育コロニーは全てカナマイシン添加培地に生育すること、すなわち該プラスミドの高度の安定性を確認した。

【0108】

【実施例7】ジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及びデスチオビオチンシンセターゼの製造

培地 (尿素0.2%, 硫酸アンモニウム0.7%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.05%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  6 ppm,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim6\text{H}_2\text{O}$  6 ppm, チアミン・HCl 100 µg/l、及びビオチン200 µg/l) 100 mlを500 ml容三角フラスコに分注、滅菌 (滅菌後pH 7.0) した後、プレバクテリウム・フラバムMJ233-B103株を植菌し、無菌的にグルコースを最終濃度2% (W/V) なるように加え、30℃にて3日間振とう培養を行った。

【0109】対照としてプラスミドpCRY30-b103を保持しないプレバクテリウム・フラバムMJ233株を植菌し、同様に培養を行った。

【0110】この培養液をベツクマン遠心機 Model J2-21を用いて、8000 rpmで10分間、遠心し、菌体を集菌する。本試量菌体約5 mgに、0.5 M Tris-

HCl (pH 6.8) を 0.125 ml、10% (W/V) SDS を 0.200 ml、 $\beta$ -メルカプトエタノールを 0.050 ml を添加し、水で全量を 1.0 ml に合わせる。この試料液を沸騰水中で約 3 分間処理する。上記の試料液 1 ml に対して、0.05% (W/V) BPB と 70% (V/V) グリセロールを含む 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) の 0.1 ml を加えたものを泳動用試料液とする。

【0111】試料液を「第一化学薬品(株)」製 SDS-PAGE プレート 10/20-1010 を用い、試料を 5  $\mu$ l アプライした後、60 mA の定電流で、約 60 分間泳動する。

【0112】Coomassie Brilliant Blue R-250 の 0.25% (W/V) (正味の濃度) を含むエタノール・酢酸・水 (9:2:9、V/V) 混液にゲルプレートに浸して分離ゲル中の試料蛋白質の染色を行う。室温で約 6 時間染色した後、エタノール・酢酸・水 (25:8:65、V/V) 混液 (脱色液) に浸し、軽く振とうし、直ちに、新しい脱色液と交換する。以後は、約 1 時間ごとに新しい脱色液と交換する。この脱色操作を分離ゲル中の蛋白質のバンドがかなり明瞭に見えるようになるまで繰り返す (3~5 時間)。つぎに、分離ゲルをメタノール・酢酸・水 (10:15:175、V/V) 混液 (保存液) に浸して、蛋白質の存在していない部分 (バックグラウンド) を完全に脱色する。かくして、ゲル上に分子量 4 万と、約 2 万の 2 つのタンパク質のバンドとして染色されていることにより、各々、ジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼおよび、デスチオピオチンシンセターゼが菌体内で産生されていることを確認することができる。このバンドの濃度を、ファルマシア社製「Ultro Scan XL レーザーデンスitomーター」を用いて、測定した結果、プレビバクテリウム・フラバム MJ233-B103 株中に含まれるジアミノペラルゴン

配列:

```

ATG GAA AAC CCC AGC TTG CGC GAG CTT GAT CAC CGA AAC ATC TGG CAC 48
Met Glu Asn Pro Ser Leu Arg Glu Leu Asp His Arg Asn Ile Trp His
1           5           10          15
CCG TAT GCC GCG CCG GCG GTG CGC AAC AGA CTC GTC ACC AAC ACT GAT 96
Pro Tyr Ala Ala Pro Gly Val Arg Asn Arg Leu Val Thr Asn Thr Asp
20          25          30
GGG GTG TTC TTG ACG CTG GAA GAT GGC AGC ACC GTG ATT GAC GCG ATG 144
Gly Val Phe Leu Thr Leu Glu Asp Gly Ser Thr Val Ile Asp Ala Met
35          40          45
AGC TCC TGG TGG TCG GCA ATT CAT GGA CAC GGA CAC CCC CGA CTG AAA 192
Ser Ser Trp Trp Ser Ala Ile His Gly His Gly His Pro Arg Leu Lys
50          55          60
CGT GCC GCC CAA AAA CAA ATC GAC ACC ATG AGT CAC GTC ATG TTC GGC 240
Arg Ala Ala Gln Lys Gln Ile Asp Thr Met Ser His Val Met Phe Gly
65          70          75          80
GGA CTA ACC CAC GAG CCC GCC ATT AAG CTC ACC CAC AAA CTC CTC AAT 288

```

酸アミノトランスフェラーゼ及びデスチオピオチンシンセターゼの含量は、pCRY30-bio3 を保持しないプレビバクテリウム・フラバム MJ-233 株に比べて、約 5 倍に上昇していることが明らかとなった。

【0113】

【発明の効果】本発明の新規な DNA 断片は、コリネ型細菌のピオチン生合成に関与する酵素のうち、ジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及びデスチオピオチンシンセターゼをコードする遺伝子 (bioA bioD) を含む DNA 断片であり、該 DNA 断片を含む本発明のプラスミドを用いることにより、コリネ型細菌に属する微生物の遺伝子操作による改良が可能となる。

【0114】また、このようにして改良された本発明のコリネ型細菌に属する微生物を培養することにより、微生物菌体内でジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及びデスチオピオチンシンセターゼの産生が増加し、該酵素の菌体内への高度蓄積が可能となる。

【0115】

【配列表】配列番号: 1

20 配列の長さ: 1272

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

起源

生物名: プレビバクテリウム フラバム (Brevibacterium flavum)

株名: MJ233

配列の特徴

30 特徴を表す記号: Peptide

存在位置: 1-1269

特徴を決定した方法: S

35	36
Gly Leu Thr His Glu Pro Ala Ile Lys Leu Thr His Lys Leu Leu Asn	
85	90 95
CTC ACT GCC AAT GCC TTT GAC CAC GTC TTT TAT TCC GAT TCG GGC TCG	336
Leu Thr Gly Asn Ala Phe Asp His Val Phe Tyr Ser Asp Ser Gly Ser	
100	105 110
GTC TCG GTG GAG GTC GCC ATC AAA ATG GCA CTG CAG GCC TCC AAA GGA	384
Val Ser Val Glu Val Ala Ile Lys Met Ala Leu Gln Ala Ser Lys Gly	
115	120 125
CAA GGC CAC CCG GAA CGC ACA AAA CTC CTC ACC TGG CGG TCC GGC TAC	432
Gln Gly His Pro Glu Arg Thr Lys Leu Leu Thr Trp Arg Ser Gly Tyr	
130	135 140
CAC GGA GAC ACA TTC ACC GCG ATG AGC GTG TGC GAC CCA GAA AAT GGC	480
His Gly Asp Thr Phe Thr Ala Met Ser Val Cys Asp Pro Glu Asn Gly	
145	150 155 160
ATG CAT AGC CTC TGG AAA GGC ACA CTC CCC GAG CAG ATT TTC GCC CCC	528
Met His Ser Leu Trp Lys Gly Thr Leu Pro Glu Gln Ile Phe Ala Pro	
165	170 175
GCC CCA CCA GTT CGG GGG TCA TCG CCG CAG GCA ATT TCC GAG TAC CTG	576
Ala Pro Pro Val Arg Gly Ser Ser Pro Gln Ala Ile Ser Glu Tyr Leu	
180	185 190
CAC AGC ATG GAA TTG CTT ATC GAC GAG ACC GTC TCC GCA ATC ATC ATC	624
His Ser Met Glu Leu Leu Ile Asp Glu Thr Val Ser Ala Ile Ile Ile	
195	200 205
GAA CCG ATC GTC CAA GGC GCT GGA GGC ATG CGC TTT CAC GAT GTC GCA	672
Glu Pro Ile Val Gln Gly Ala Gly Gly Met Arg Phe His Asp Val Ala	
210	215 220
CTC ATT GAA GGA GTC GCG GCA CTG TGC AAG AAG CAC GAT CGT TTC TTG	720
Leu Ile Glu Gly Val Ala Ala Leu Cys Lys Lys His Asp Arg Phe Leu	
225	230 235 240
ATC GTC GAT GAA ATT GCC ACC GGT TTC GGC CGC ACC GGT GAA CTA TTT	768
Ile Val Asp Glu Ile Ala Thr Gly Phe Gly Arg Thr Gly Glu Leu Phe	
245	250 255
GCC ACG TTA AGC AAT GGC GTA CAA CCA GAC ATC ATG TGT GTG GGC AAG	816
Ala Thr Leu Ser Asn Gly Val Gln Pro Asp Ile Met Cys Val Gly Lys	
260	265 270
GCC CTC ACC GGT GGA TTC ATG TCT TTT GCC GCC ACT GTA TGC ACG GAC	864
Ala Leu Thr Gly Gly Phe Met Ser Phe Ala Ala Thr Val Cys Thr Asp	
275	280 285
AAG GTG GCT CAA TTG ATC AGA TCC CCA GAA GGC GGA GGT GTG CTG ATG	912
Lys Val Ala Gln Leu Ile Arg Ser Pro Glu Gly Gly Gly Val Leu Met	
290	295 300
CAT GGC CCC ACC TTT ATG GCT AAT CCT CTG GCC TGT GAG GTT TCG CAC	960
His Gly Pro Thr Phe Met Ala Asn Pro Leu Ala Cys Glu Val Ser His	
305	310 315 320
GCT TCG CTA GAA ATC ATT GAG ACC GGC ATG TGG CAG AAA CAG GTT AAA	1008
Ala Ser Leu Glu Ile Ile Glu Thr Gly Met Trp Glu Lys Gln Val Lys	
325	330 335
AAA ATC GAA GCC AAA CIT ATC GCA GGC CIT TCC CCA CIT CGA TGT ATT	1056
Lys Ile Glu Ala Lys Leu Ile Ala Gly Leu Ser Pro Leu Arg Cys Ile	
340	345 350

37 38  
 CCA GGA GTT GCC GAT GTC CGG GTT CTC GGC GCG ATT GGC GTC ATC GAA 1104  
 Pro Gly Val Ala Asp Val Arg Val Leu Gly Ala Ile Gly Val Ile Glu  
 355 360 365  
 ATG GAA CAA AAT GTG AAT GTC GAA GAA GCC ACT CAG GCT GCA TTA GAT 1152  
 Met Glu Gln Asn Val Asn Val Glu Glu Ala Thr Gln Ala Ala Leu Asp  
 370 375 380  
 CAC GGT GTG TGG ATC CGC CCC TTT GGA CGC TTG CTC TAT GTC ATG CCC 1200  
 His Gly Val Trp Ile Arg Pro Phe Gly Arg Leu Leu Tyr Val Met Pro  
 385 390 395 400  
 CCA TAT ATC ACC ACG TCA GAG CAA TGC GCA CAG ATC TGC CGC GCG CTT 1248  
 Pro Tyr Ile Thr Thr Ser Glu Gln Cys Ala Gln Ile Cys Arg Ala Leu  
 405 410 415  
 CAT GCT GCA GTT AAA GGA AAA TAA 1272  
 His Ala Ala Val Lys Gly Lys  
 420

配列番号: 2

配列の長さ: 675

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

起源

生物名: プレビバクテリウム フラバム (Brevibacteri  
um flavum)

株名: MJ233

20 配列の特徴

特徴を表す記号: Peptide

存在位置: 1-672

配列を決定した方法: S

配列:

ATG CCA TTT TTA TTT GTC AGC GGC ACC GGA ACC GGG GTT GGA AAG ACC 48  
 Met Pro Phe Leu Phe Val Ser Gly Thr Gly Thr Gly Val Gly Lys Thr  
 1 5 10 15  
 TTC TCC ACA GCC GTT TTG GTT CGT TAC TTA GCC GAT CAA GGA CAC GAT 96  
 Phe Ser Thr Ala Val Leu Val Arg Tyr Leu Ala Asp Gln Gly His Asp  
 20 25 30  
 GTT CTG CCC GTA AAG CTC GTC CAA ACA GGT GAA CTT CCA GGC GAA GGA 144  
 Val Leu Pro Val Lys Leu Val Gln Thr Gly Gln Leu Pro Gly Gln Gly  
 35 40 45  
 GAC ATC TTC ACC ATT GAA CGC TTG ACT GGA ATT GCT GGA GAG GAA TTT 192  
 Asp Ile Phe Thr Ile Gln Arg Leu Thr Gly Ile Ala Gly Gln Gln Phe  
 50 55 60  
 GCT CGT TTC AAA GAC CCT CTT GCG CCA AAT CTG GCA GCC CGA CGA GAG 240  
 Ala Arg Phe Lys Asp Pro Leu Ala Pro Asn Leu Ala Ala Arg Arg Glu  
 65 70 75 80  
 GGG ATC GAG CCA ATA CAG TTT GAT CAG ATT ATC TCG TGG CTT CGT GGT 288  
 Gly Ile Glu Pro Ile Gln Phe Asp Gln Ile Ile Ser Trp Leu Arg Gly  
 85 90 95  
 TTT GAC GAC CCA GAT CGC ATC ATT GTG GTG GAG GGC GCT GGT GGC CTG 336  
 Phe Asp Asp Pro Asp Arg Ile Ile Val Val Gln Gly Ala Gly Gly Leu  
 100 105 110  
 CTG GTC AGA TTA GGG GAA GAT TTC ACC CTG GCA GAT GTT GCC TCC GCT 384  
 Leu Val Arg Leu Gly Glu Asp Phe Thr Leu Ala Asp Val Ala Ser Ala  
 115 120 125  
 TTG AAT GCA CCC TTA GTG ATT TGG ACA AGC ACC GGA TTG GGA AGC CTC 432  
 Leu Asn Ala Pro Leu Val Ile Trp Thr Ser Thr Gly Leu Gly Ser Leu

39 40

130 135 140

AAC GCT GCT GAA TTA AGC GTT GAG GCA GCA AAC CGC CGA GGA CTC ACA 480

Asn Ala Ala Glu Leu Ser Val Glu Ala Ala Asn Arg Arg Gly Leu Thr

145 150 155 160

GTG TTG GGA GTC CTC GGC GGT TCG ATC CCT CAA AAT CCT GAT CTA GCT 528

Val Leu Gly Val Leu Gly Gly Ser Ile Pro Gln Asn Pro Asp Leu Ala

165 170 175

ACG ATG CTT AAT CTC GAA GAA TTT GAG AGA GTC ACC GGC GTG CCC TTT 576

Thr Met Leu Asn Leu Glu Glu Phe Glu Arg Val Thr Gly Val Pro Phe

180 185 190

TGG GGA GCT TTG CCG GAA GGG TTG TCA CGG GTG GAG GGG TTC GTC GAA 624

Trp Gly Ala Leu Pro Glu Gly Leu Ser Arg Val Glu Gly Phe Val Glu

195 200 205

AAG CAA TCT TTT CCG GCC CTT GAT GCC TTT AAG AAA CCG CCG GCA AGG 672

Lys Gln Ser Phe Pro Ala Leu Asp Ala Phe Lys Lys Pro Pro Ala Arg

210 215 220

TGA 675

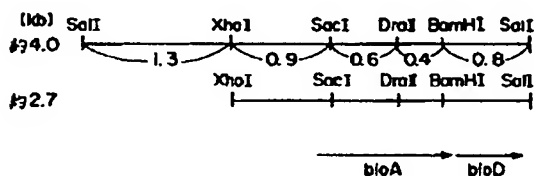
## 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のジアミノペラルゴン酸アミノトランス  
フェラーゼ及びデスチオピオチンシンターゼをコード  
する遺伝子 (b i o A b i o D) を含むDNA断片の  
制限酵素切断点地図。

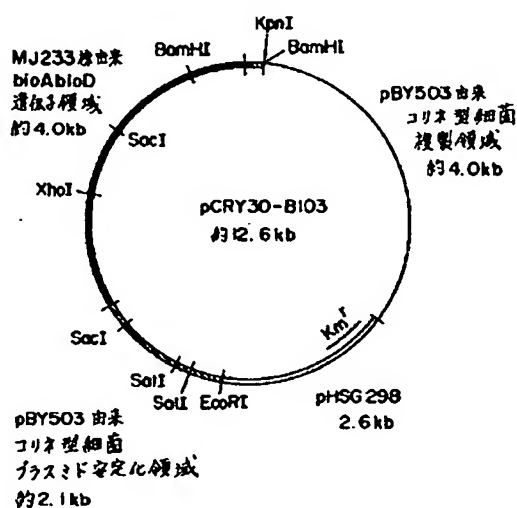
【図2】本発明のb i o A及びb i o D塩基配列決定の  
戦略図。

【図3】本発明のプラスミドpCRY30-b i o 3の  
制限酵素切断点地図。

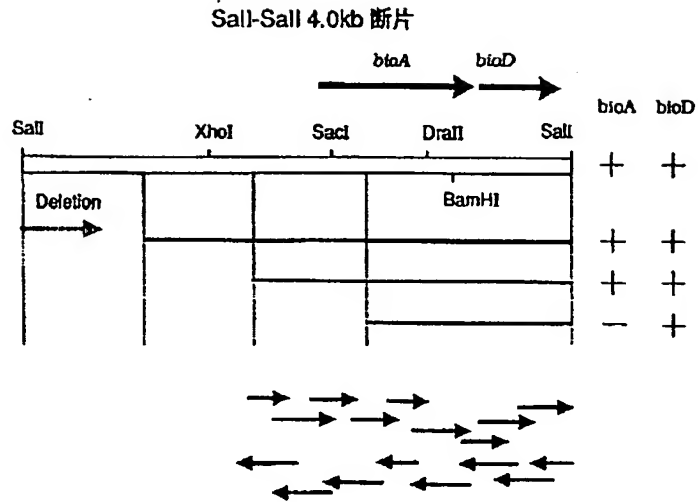
【図1】



【図3】



【図2】



## フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 N 15/52

// (C 1 2 N 15/54

C 1 2 R 1:13)

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:13)

(72) 発明者 畠山 和久

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号三  
菱油化株式会社筑波総合研究所内

(72) 発明者 久留主 泰朗

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号三  
菱油化株式会社筑波総合研究所内

(72) 発明者 湯川 英明

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号三  
菱油化株式会社筑波総合研究所内